

7. Ермолаева, Е. Н. Особенности липидемии при хронической физической нагрузке субмаксимальной мощности / Е. Н. Ермолаева, Л. В. Кривохижина // Омский научный вестник. – 2015. – Т. 144. – № 2. – С. 43–46.

8. Analysis of low density lipoproteins by preparative ultracentrifugation and refractometry / F. T. Lindgren [et al.] // J. Of lipid research. – 1964. – Vol. 5. – P. 68–74. (in USA).

9. Folch, J. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues / J. Folch, M. Lees, S. G. Sloane // J Biol. Chem. – 1957. – № 226. – P. 497–509.

10. Кейтс, М. Техника липидологии / М. Кейтс. – Москва, Мир, 1975. – 358 с.

11. A universal reagent for fosfolipids analisis / V. E. Vaskowsky [et al.] // J. Chromatogr. – 1975. – Vol. 114. – P. 129–141.

12. Sphingomyelin in High-Density Lipoproteins: Structural Role and Biological Function / Roberto Martínez-Beamonte [et al] // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – Vol. 14. – № 4. – P. 7716–7741.

13. Lee, Bo-Ae. Effect of regular swimming exercise on the physical composition, strength, and blood lipid of middle-aged women / Bo-Ae Lee, Deuk-Ja Oh // J Exerc. Rehabil. – 2015 – Vol. 11. –

№ 5. – P. 266–271.

14. Miyares, M. A. Patient considerations and clinical impact of cholesteryl ester transfer protein inhibitors in the management of dyslipidemia: focus on anacetrapib / M. A. Miyares, K. Davis // Vasc. Health. Risk. Manag. – 2012. – № 8. – P. 483–493.

15. Титов, В. Н. Изоферменты стеарил-коэнзим А-Десатуразы и действие инсулина в свете филогенетической теории патологии. Олеиновая жирная кислота в реализации биологических функций трофологии и локомоции / В. Н. Титов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – № 11. – С. 16–26.

16. Длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты и их роль в детском питании. Обзор литературы / Т. Э. Боровик [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2012. – Т. 11. – № 4. – С. 21–28.

Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27/3,
УО «Витебский государственный
ордена Дружбы народов
медицинский университет»,
научно-исследовательская лаборатория,
тел.факс +375(212) 64 81 31,
oss62@mail.ru
Осочук С.С.

Поступила 13.02.2017 г.

С. Л. Федорук¹, Ю. П. Истомин², Д. А. Церковский², Е. Л. Протопович²,
К. А. Фроленков¹, С. Н. Соколов¹, Т. В. Трухачева¹, В. П. Хейдоров³

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ОСНОВЕ ДИМЕТИЛОВОГО ЭФИРА ХЛОРИНА Е6 И ХЛОРИНА Е6

¹РУП «Белмедпрепараты», г. Минск, Республика Беларусь

²РНПЦ Онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, г. Минск,
Республика Беларусь

³Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет

Исследована эффективность фотодинамической терапии (ФДТ) с применением лекарственных форм фотосенсибилизаторов (ФС) на основе диметилового эфира хлорина е6 (ДМЭ Хеб) и хлорина е6. Показано, что проведение ФДТ с применением лиофилизата на основе ДМЭ Хеб приводит к торможению роста и некрозу опухоли на таком же уровне, как и при применении уже известного лекарственного средства (ЛС) Фотолон. При проведении ФДТ в дозе фотооблучения 100 Дж/см² терапевтический эффект лиофилизата на основе ДМЭ Хеб приводит к более существенному увеличению продолжительности жизни и к высокому проценту (50%) излеченности животных.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, фотодинамическая терапия, саркома М1, динамика роста опухоли, средняя продолжительность жизни (СПЖ).

ВВЕДЕНИЕ

Разработанный на РУП «Белмедпрепараты» новый фотосенсибилизатор представляет собой лиофилизат на основе ДМЭ Хе6, который стандартизирован по всем показателям качества. Для определения целесообразности дальнейшей разработки данного потенциального ЛС необходимо изучение его эффективности в сравнении с уже известным ФС – Фотолоном [1–3]. Целью настоящих исследований является экспериментальное изучение противоопухолевой активности ЛС на основе ДМЭ Хе6 в сравнении с ЛС Фотолон. Противоопухолевую активность оценивали по влиянию ФДТ с исследуемыми ЛС на динамику роста и площадь некроза опухолевой ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы ФС: ЛС Фотолон с. 010315 и экспериментальная серия нового ФС (лиофилизат на основе ДМЭ Хе6) с. 010315 во флаконах по 100 мг препарата в каждом.

Исследования выполнены на 155 белых беспородных крысах обоего пола, разводки вивария РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова. Животные содержались в стандартных условиях пищевого и питьевого рациона, в затемненных помещениях. Показатели влажности, температуры, освещенности в помещении отвечали действующим санитарным правилам.

Исследования выполнены на экспериментальной модели Российской коллекции опухолей – саркоме М-1 (Са М-1), закупленной в Банке опухолевых штаммов ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН (Москва) на 7-е сутки после перевивки. Опухоли перевивали подкожно, в паховую область, путем введения 0,5 мл 10%-ой опухолевой взвеси в растворе Хенкса. Крыс с перевитой опухолью вводили в наркоз путем внутримышечного введения дроперидола в дозе 5 мг/кг и фентанила – 0,05 мг/кг.

Фотосенсибилизаторы вводили животным внутривенно, однократно, в дозе 5 мг/кг массы тела животного, в помещении с низким уровнем освещенности. В качестве растворителя использовали готовый стерильный изотонический раствор натрия хлорида.

Фотооблучение опухолей проводили на

лазерной медицинской установке «ИМАФ АХИОН» (Республика Беларусь) с длиной волны излучения 661 нм в дозах 50 Дж/см² и 100 Дж/см² с помощью световода с микролинзой. Плотность мощности составляла 0,4 Вт/см², выходная мощность – 0,3 Вт, диаметр светового пятна – 2 см, время воздействия – 8,7 мин при фотооблучении в дозе при 50 Дж/см². Время воздействия при дозе 100 Дж/см² составляло 17,5 мин. Для контроля мощности излучения на выходе световода использовали измеритель мощности.

Сравнительную оценку противоопухолевой эффективности ФДТ по площади некрозов осуществляли спустя 24 часа после фотооблучения путем количественного расчета площадей некрозов, образовавшихся в опухолях при витальном окрашивании животных-опухоленосителей синькой Эванса. Для этого 0,6%-ый раствор синьки в физиологическом растворе вводили крысам внутривенно из расчета 1 мл на 100 г массы тела. Через 2 часа животных умерщвляли хлороформом, опухоль иссекали и фиксировали в 10%-ом формалине. После фиксации делали поперечные срезы опухолевого узла по наибольшему диаметру и регистрировали фотокамерой, сопряженной с компьютером. Для оценки образовавшихся после ФДТ площадей некрозов и оставшихся жизнеспособных зон опухоли использовали метод компьютерного сканирования цветовых оттенков гистотопографических срезов опухолей.

Противоопухолевую эффективность ФДТ оценивали также по:

– динамике роста опухолей: для этого через каждые 72–96 часов осуществляли измерение объема опухолей с последующим построением кривых роста. Объем опухолей определяли по формуле:

$$V = (a \times b \times c) \pi / 6,$$

где: a , b , c – линейные размеры опухоли в см, V – объем опухоли в см³.

– проценту торможения роста опухолей по объему (ТРО):

$$\text{ТРО}\% = [(V_{\text{контроль}} - V_{\text{опыт}}) / V_{\text{контроль}}] \times 100\%,$$

где: $V_{\text{контроль}}$ и $V_{\text{опыт}}$ – средний объем

опухолей в контрольной и опытной группах животных (см³);

– средней продолжительности жизни (СПЖ) павших животных;

– проценту излеченных животных – отсутствие опухоли в течение 60 дней наблюдения после лечения.

Результаты экспериментов обработаны в программе Excel и OriginPro 7.0 с определением средних значений и ошибки средней. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучена противоопухолевая эффективность ФДТ с двумя ФС по площади некрозов в Са М-1 после их внутривенного введения в дозе 5,0 мг/кг и фотооблучения в дозе 50 Дж/см² и дозе 100 Дж/см².

При количественном определении площадей некрозов, образовавшихся в опухолях при витальном окрашивании животных-опухоленосителей синькой Эванса, сопоставимые по величине повреждения обнаружены в Са М-1 крыс после внутривенного введения ЛС Фотолон и нового ФС и фотооблучения в дозе 50 Дж/см² (таблица 1). После фотооблучения в дозе 100 Дж/см² больший по площади некроз образовался после внутривенного облучения новым ФС, что показывает его высокие возможности в ФДТ (таблица 2).

В таблицах 3–6 и на рисунках 1–2 представлены данные о противоопухолевой эффективности ЛС Фотолон и лиофилизата на основе ДМЭ Хе6. Ее

оценку осуществляли путем сравнения динамики роста опухолей, СПЖ павших животных, процента торможения роста опухолей по объему, количества излеченных животных после внутривенного введения каждого из ФС в дозе 5,0 мг/кг и фотооблучения в дозах 50 Дж/см² и 100 Дж/см².

Оценка динамики роста опухоли (рисунк 1) позволяет сделать вывод о том, что после внутривенного введения ЛС и фотооблучения в дозе 50 Дж/см² скорость роста опухоли сопоставима при применении обоих исследуемых средств. При дозе фотооблучения в 100 Дж/см² скорость роста опухоли более существенно замедляется при применении нового ФС, что подтверждает более высокую эффективность ДМЭ Хе6, чем Фотолон в данных условиях эксперимента (рисунк 2).

В эксперименте также была проведена оценка торможения роста опухоли при использовании исследуемых ЛС. При дозе фотооблучения 50 Дж/см² степень торможения роста опухоли у различных ФС по прошествии 21 суток отличалась незначительно (32,6 для ЛС Фотолон и 43,3 для нового ФС) (таблица 3).

При дозе фотооблучения 100 Дж/см² заметно выделяется новый фотосенсибилизатор на основе ДМЭ Хе6, при воздействии которого процент торможения роста опухоли достигает 88,1 в сравнении с 70,5 для ЛС Фотолон (таблица 4).

В таблицах 5 и 6 приведены данные о средней продолжительности жизни животных с перевивными опухолями после проведения ФДТ с изучаемыми ФС.

Таблица 1 – Площадь некрозов в Са М-1 после внутривенного введения ФС и фотооблучения в дозе 50 Дж/см²

| № п/п | Фотосенсибилизатор | Число срезов | Площадь среза опухоли, см ² | Площадь некроза к исходной площади | |
|-------|------------------------------|--------------|--|------------------------------------|-----------|
| | | | | см ² | % |
| 1 | ЛС Фотолон | 35 | 3,85±0,16 | 2,21±0,09 | 59,3±2,30 |
| 2 | Леофилизат на основе ДМЭ Хе6 | 35 | 4,05±0,10 | 2,42±0,09 | 59,4±1,41 |

Таблица 2 – Площадь некрозов в Са М-1 после внутривенного введения ФС и фотооблучения в дозе 100 Дж/см²

| № п/п | Фотосенсибилизатор | Число срезов | Площадь среза опухоли, см ² | Площадь некроза к исходной площади | |
|-------|------------------------------|--------------|--|------------------------------------|-----------|
| | | | | см ² | % |
| 1 | ЛС Фотолон | 35 | 2,99±0,08 | 2,04±0,05 | 69,8±1,91 |
| 2 | Леофилизат на основе ДМЭ Хе6 | 35 | 2,92±0,07 | 2,43±0,05 | 83,3±0,88 |

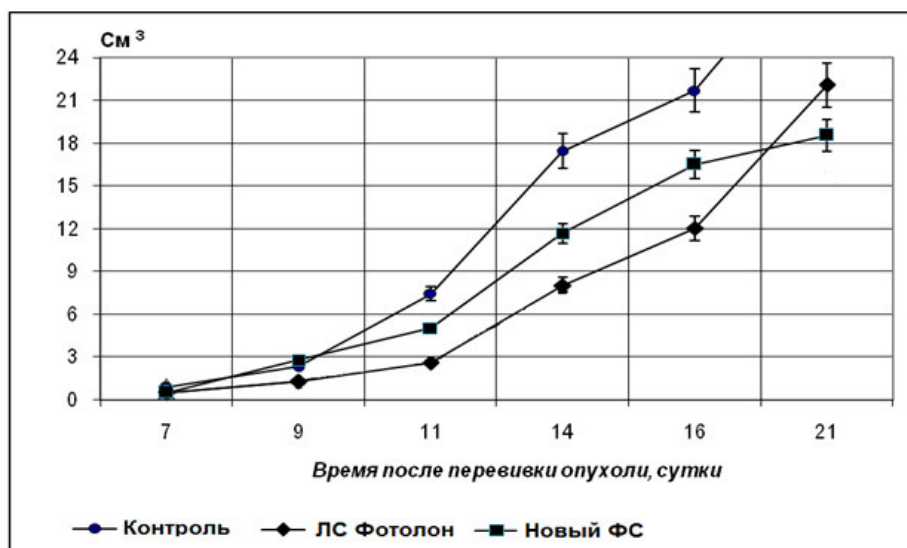


Рисунок 1 – Динамика роста Са М-1 крыс после введения ФС в дозе 5,0 мг/кг и фотооблучения в дозе 50 Дж/см²

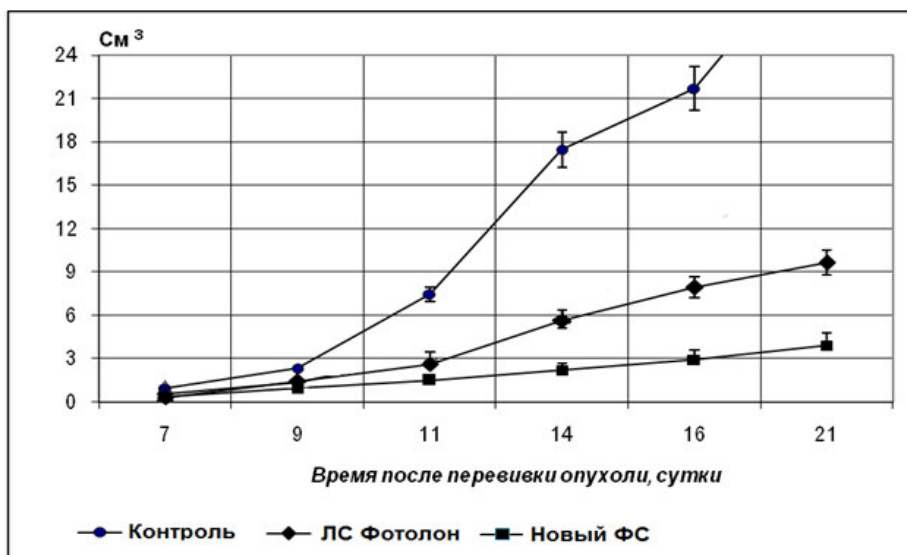


Рисунок 2 – Динамика роста Са М-1 крыс после введения ФС в дозе 5,0 мг/кг и фотооблучения в дозе 100 Дж/см²

Таблица 3 – Процент торможения роста Са М-1 крыс по объему по отношению к контролю после введения ФС в дозе 5,0 мг/кг и фотооблучении в дозе 50 Дж/см²

| ФС | Процент торможения роста Са М-1 по объему на сутки | | | | | | |
|------------------------------|--|------|------|------|------|------|------|
| | 7 | 9 | 11 | 14 | 16 | 18 | 21 |
| ЛС Фотолон | 33,0 | 44,5 | 65,2 | 53,9 | 55,2 | 40,1 | 32,6 |
| Лиофилизат на основе ДМЭ Хе6 | 25,5 | 19,2 | 32,5 | 33,1 | 23,9 | 29,9 | 43,3 |

Таблица 4 – Процент торможения роста Са М-1 крыс по объему по отношению к контролю после введения ФС в дозе 5,0 мг/кг и фотооблучения в дозе 100 Дж/см²

| ФС | Процент торможения роста Са М-1 по объему на сутки | | | | | | |
|------------------------------|--|------|------|------|------|------|------|
| | 7 | 9 | 11 | 14 | 16 | 18 | 21 |
| ЛС Фотолон | 53,8 | 39,5 | 64,6 | 67,8 | 63,4 | 57,6 | 70,5 |
| Лиофилизат на основе ДМЭ Хе6 | 50,9 | 59,3 | 79,7 | 87,4 | 86,4 | 79,8 | 88,1 |

Таблица 5 – Средняя продолжительность жизни павших животных с Са М-1 при введении ФС в дозе 5,0 мг/кг и фотооблучении в дозе 50 Дж/см²

| № п/п | Контроль | ЛС Фотолон | Лиофилизат на основе ДМЭ Хеб |
|-------|----------|------------|------------------------------|
| 1 | 2 | 3 | 5 |
| 1 | 24 | 14 | 19 |
| 2 | 18 | 14 | 22 |
| 3 | 24 | 16 | 32 |
| 4 | 26 | 23 | 24 |
| 5 | 20 | 12 | 17 |
| 6 | 15 | 24 | 22 |
| 7 | 23 | 24 | 18 |
| 8 | 16 | 25 | излечена |
| 9 | 27 | 21 | излечена |
| 10 | 16 | 13 | излечена |
| X± | 20,70 | 18,6 | 22,0 |
| Sx | 0,95 | 1,66 | 1,91 |

Таблица 6 – Средняя продолжительность жизни крыс (сутки) с Са М-1 после введения ФС в дозе 5,0 мг/кг и фотооблучения в дозе 100 Дж/см²

| № п/п | Контроль | ЛС Фотолон | Лиофилизат на основе ДМЭ Хеб |
|-------|----------|------------|------------------------------|
| 1 | 24 | 24 | 27 |
| 2 | 18 | 11 | излечена |
| 3 | 24 | 20 | излечена |
| 4 | 26 | 25 | 26 |
| 5 | 20 | 18 | излечена |
| 6 | 15 | излечена | излечена |
| 7 | 23 | излечена | 32 |
| 8 | 16 | 11 | излечена |
| 9 | 27 | 19 | 16 |
| 10 | 16 | 27 | 35 |
| X± | 20,70 | 19,37 | 27,2 |
| Sx | 0,95 | 2,12 | 3,24 |

При внутривенном введении изучаемых ФС и фотооблучении в дозе 50 Дж/см² больший процент излеченных животных был достигнут при применении нового ФС (30%). Значение СПЖ для данного ФС (22,0 дня) незначительно, но все же превышает СПЖ для ЛС Фотолон (18,6 дней) (таблица 5).

При проведении ФДТ с дозой фотооблучения 100 Дж/см² количество излеченных животных при применении нового ФС было существенно больше и достигло 50%, а значение СПЖ для этого ФС составило 27,2 дня и также превысило СПЖ для ЛС Фотолон – 19,37 дней (таблица 6).

В целом, анализ полученных результатов позволяет сделать выводы о том, что при определенных условиях новый ФС

на основе ДМЭ проявляет более высокую противоопухолевую активность. Он существенно превосходит ЛС Фотолон по степени некроза перевивных опухолей, торможению их роста, средней продолжительности жизни экспериментальных животных и их излеченности при фотооблучении в дозе 100 Дж/см². Полученные результаты позволяют рассматривать ЛС на основе ДМЭ Хеб как весьма перспективный для дальнейших исследований и разработки нового ФС.

Следует отметить, что в эксперименте был выявлен также ряд побочных эффектов, проявляющихся после проведения ФДТ, которые требуют дальнейшего изучения и могут быть нивелированы при оптимизации доз ЛС и мощности светового воздействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В результате проведенных исследований эффективности ФДТ с применением двух различных ФС установлено, что при различных дозах фотооблучения оба ФС проявляют высокую противоопухолевую активность.

2. При определенных условиях новый ФС на основе ДМЭ превосходит в эффективности ЛС Фотолон (по степени некроза перевивных опухолей, торможению их роста, средней продолжительности жизни экспериментальных животных и их излеченности при фотооблучении в дозе 100 Дж/см²).

3. Полученные результаты подтверждают перспективность дальнейшей разработки нового фотосенсибилизатора на основе ДМЭ Хе6.

SUMMARY

S. L. Fiedaruk, J. P. Istomin,
D. A. Tserkovskiy, E. L. Protopovich,
K. A. Fralengkou, S. N. Sakalou,
T. V. Trukhacheva, V. P. Kheidorov

INVESTIGATION OF ANTITUMOUR ACTIVITY OF DOSAGE FORMS ON THE BASE OF DME CE6 AND CHLORINE E6

Efficacy of photodynamic therapy (PDT) with the use of dosage forms of photosensitizers (PS) on the base of chlorine dimethylester e6 (DME Ce6) and chlorine e6 has been investigated. It has been shown that conduction of PDT with lyophilizate on the base of chlorine dimethylester e6 (DME Ce6) causes inhibition of tumour growth and its necrosis at the same level as with well-known drug

Photolon. While conducting PDT at a dose of 100 J/cm² irradiation therapeutic effect of lyophilizate on the base of DME Ce6 leads to a more significant increase in life span and high percentage (50%) of animals recovery.

Keywords: photosensitizer, photodynamic therapy, sarcoma M-1, selectivity of absorption, tumour growth dynamics, average life span (ALS).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / редкол.: Р. У. Хабриев [и др.]. – Москва: Медицина, 2005. – С. 832.

2. EMA/CHMP/ICH/731268/1998: Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals [Electronic resource] / ICH S6 (R1). – 1998. – Mode of access: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content. – Date of access: 05.02.2017.

3. Фотолон® – новое средство для фотодинамической терапии. Обзор результатов фармацевтических, фармакологических и клинических исследований / Т. В. Трухачева [и др.] / РУП «Белмедпрепараты». – 2009. – Т. 10. – С. 15–29.

Адрес для корреспонденции:

220007, Республика Беларусь,
г. Минск, ул. Фабрициуса, 30,
РУП «Белмедпрепараты»,
тел./факс 8 (017) 380 00 36,
e-mail: lab659@yandex.ru,
Федорук С. Л.

Поступила 10.03.2017 г.